This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

PROBIOTICALLY ACTING FORMULATION

Patent Number:

WO9716198

Publication date:

1997-05-09

Inventor(s):

VIERNSTEIN HELMUT (AT); POLHEIM DIETHER (AT); LAULUND SVEND (DK)

Applicant(s):

CHR HANSEN BIOSYSTEMS A S (DK); VIERNSTEIN HELMUT (AT); POLHEIM

DIETHER (AT); LAULUND SVEND (DK)

Requested

Patent:

Application

Number:

WO1996AT00214 19961104

Priority Number

(s):

AT19950001810 19951102

IPC

Classification:

A61K35/74; A23L1/03

EC Classification: A23L1/03M, A61K35/74

Equivalents:

AT181095, F AT405235B, AU7265796

Cited Documents: EP0627173; WO8905849; WO9534292; JP1066124

Abstract

The invention relates to a probiotically acting formulation which comprises micro-organisms stabilised by drying and matrix constituents resisting gastric juice; this formulation is in the form of dry granules. The invention also relates to the use of said formulation.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/16198

A61K 35/74, A23L 1/03

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

9. Mai 1997 (09.05.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/AT96/00214

(22) Internationales Anmeldedatum: 4. November 1996 (04.11.96)

(30) Prioritätsdaten:

A 1810/95

2. November 1995 (02.11.95) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CHR. HANSEN BIOSYSTEMS A/S [DK/DK]; Bøge Alle 10-12, DK-2970 Horsholm (DK).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VIERNSTEIN, Helmut [AT/AT]; Althanstrasse 14, A-1090 Wien (AT). POLHEIM, Diether [AT/AT]; Neustiftgasse 26/27, A-1070 Wien (AT). LAULUND, Svend [DK/DK]; Bøge Alle 10-12, DK-2970 Horsholm (DK).

(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROBIOTICALLY ACTING FORMULATION

(54) Bezeichnung: PROBIOTISCH WIRKSAME FORMULIERUNG

(57) Abstract

The invention relates to a probiotically acting formulation which comprises micro-organisms stabilised by drying and matrix constituents resisting gastric juice; this formulation is in the form of dry granules. The invention also relates to the use of said formulation.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben wird eine probiotisch wirksame Formulierung, umfassend durch Trocknung stabilisierte Mikroorganismen und magensaftresistente Matrixkomponenten, wobei diese Formulierung in trocken-granulierter Form vorliegt, sowie deren Verwendung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Osterreich	GE	Georgien	NE	Niger
ΑU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neusceland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumanien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco ·	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dånemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
es	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Probiotisch wirksame Formulierung

Die Erfindung betrifft probiotisch wirksame Zusammensetzungen.

Der allgemeine Begriff "Milchsäurebakterien" umfaßt eine Kategorie von Mikroorganismen, die in den letzten Jahren, bedingt durch ihre humanspezifischen und lebensmitteltechnologischen Eigenschaften, in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt ist. Der Begriff "Probiotika" als Wachstumsförderer ursprünglich auf den Bereich der Futtermittel beschränkt, bezeichnet lebende Mikroorganismen, die als Nahrungszusatz das Gleichgewicht der Verdauungsorganismen günstig beeinflussen. Heute sind Probiotika jedoch generell für ein weites Feld von vorwiegend milchsäurehältigen Präparaten, Substraten, Lebensund Futtermitteln relevant und werden sowohl im human- als auch veterinärmedizinischen Bereich sowie bei der Tierernährung eingesetzt. Taxonomisch beinhaltet das Spektrum der Milchsäurebakterien derzeit im wesentlichen die Gattungen Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Bifidobacterium, Carnobacterium und Sporolactobacillus (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, IX. Aufl.). Einige dieser Vertreter (Lactobacillus, Bifidobacterium und Enterococcus) gelten als natürliche und nützliche Darmbewohner des Menschen (und auch der Tiere) und treten dort - in Abhängigkeit vom Darmabschnitt, Lebensalter und Ernährungsgewohnheiten - in unterschiedlich hohen Keimzahlen auf. Allgemein wird die Wirkung der Milchsäurebakterien in vier Haupteffekte unterteilt:

- 1. Biochemische (u.a. Verbesserung der Nährstoffverwertung)
- 2. Physiologische (v.a. Stimulierung der Darmperistaltik)
- 3. Antimikrobielle (z.B. Wachstumshemmung pathogener Keime)
- 4. Kompetitive (z.B. Inaktivierung von Enterotoxinen).

Die Applikation bestimmter Milchsäurebakterien, entweder über den Nahrungsmittelweg oder über die Einnahme spezieller pharmazeutischer Präparate, erscheint daher aus den oben genannten Gründen als zielführend. Im Vordergrund stehen heute diätetische, prophylaktische und therapeutische Indikationen, wie u.a. bei Reisediarrhoe, regulierende Funktion bei Stress-Situationen, Krebstherapie, Behandlung von Obstipationen, Zahnfleischentzündungen, Vaginitis, bei diversen Diätformen, etc..

Für eine effiziente Wirkung milchsäurehältiger Präparate ist es unbedingt notwendig, daß hohe Konzentrationen der Mikroorganismen in den Darm gelangen. Dadurch sind herkömmliche Lebensmittel mit lebenden Mikroorganismen nicht in allen Fällen anwendbar, da sie die Mikroorganismen oft in relativ niedriger Konzentration enthalten und die Gesamtmenge, die dann zugeführt werden müßte, zu groß ist (Laulund, "Commercial Aspects of Formulation, Production and Marketing of Probiotic Products" in "Human Health: The Contribution of Microorganisms", S.A.W. Gibson Ed. (1994), Springer Verlag, Seite 160).

Lebende Mikroorganismen sind schwer stabilisierbar, weswegen sie in Präparationen meist in getrockneter Form vorliegen; die Darstellung kann durch unterschiedliche Trocknungsprozesse, wie z.B. der Lyophilisation, Sprühtrocknung, etc. erfolgen.

Weiters ist bei der peroralen Verabreichung lebender Mikroorganismen zu beachten, daß je nach Bakterienart bzw. -stamm ein Teil der Bakterien bereits im Magen, der eine natürliche Barriere für Mikroorganismen darstellt, zerstört wird und nur eine geringe Anzahl überlebender Keime in den Darm gelangt (Fuller, J.Appl.Bact. 66, 1989, 365-378). Die Verarbeitung zu Tabletten mit magensaftresistenten Filmüberzügen ist insofern problematisch, da die Anzahl der lebensfähigen Mikroorganismen bereits durch den Tablettiervorgang aufgrund der einwirkenden Scherkräfte meist stark reduziert wird. Es ist sogar aus der Literatur bekannt, daß durch den Tablettiervorgang eine beträchtliche Keimzahlreduktion hervorgerufen wird, wodurch eine gewisse Dekontamination erzielt werden kann (Fassihi et al., Zbl. Pharm. 116 (1977), 1267-1271; Plumpton et al., Int.J.Pharmac. 30 (1986), 241-

246). Die Verabreichung in magensaftresistenten Hartgelatine-kapseln bleibt aufgrund der speziellen und teuren Technologie auf den pharmazeutischen Bereich beschränkt. Die Verarbeitung von probiotischen Formulierungen mit magensaftresistenten Film-überzügen wie in der pharmazeutischen Industrie (z.B. mit Überzugsmaterial wie Eudragit[®]) ist im übrigen auch darum nicht möglich, da diese Stoffe für Lebensmittelprodukte nicht zugelassen sind.

Schließlich ist bei vielen auf dem Markt befindlichen Produkten eine erhebliche Qualitätsschwankung festzustellen, was hauptsächlich darin liegt, daß die großtechnische Herstellung und Verarbeitung von probiotisch wirksamen Formulierungen aufgrund ihrer biologischen Natur heikel und nur schwer reproduzierbar sind (Brennan et al., J.Food Prot.46 (1983), 887-892).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, eine probiotisch wirksame Formulierung zur Verfügung zu stellen, welche einen hohen Grad an Magensaftresistenz aufweist, einfach als Lebensmittel-Zusatzstoff zu verarbeiten ist und in reproduzierbarer Weise auch großtechnisch hergestellt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine probiotisch wirksame Formulierung umfassend durch Trocknung stabilisierte Mikroorganismen und magensaftresistente Matrixkomponenten, welche Formulierung in trocken granulierter Form vorliegt.

Die Voraussetzungen für die Wirksamkeit von Bakterien werden erfindungsgemäß dadurch geschaffen, daß Formulierungen hergestellt werden, die aus durch Trocknung haltbar gemachten, lebensfähigen Mikroorganismen sowie aus Matrixkomponenten, die sowohl für die Herstellung der Formulierungen unverzichtbar sind, als auch einen hohen Grad an Magensaftresistenz sicherstellen, bestehen. Erst aufgrund der Einbettung von Mikroorganismen in geeignete magensaftresistente Matrixkomponenten ist es möglich, daß eine ausreichend hohe Anzahl von gewünschten, überlebenden Mikroorganismen in den Darm gelangen können. Der erfindungsgemäße Herstellungsprozeß stellt eine Granulierung von Pulvermassen auf

trockenem Weg dar, wobei der Verarbeitungsvorgang selbst nur eine geringe Verminderung der Überlebenskeimzahl verursacht.

Erst die Einbettung in geeignete magensaftresistente Matrixkomponenten ermöglicht, daß eine überraschend hohe Anzahl von lebenden Zellen in den Darm gelangen können. Dabei ist es wichtig, daß die durch Trocknung stabilisierten Mikroorganismen in trocken-granulierter Form vorliegen. Die Trockengranulierung ist ein ausreichend schonendes Verfahren, bei dem ein hoher Prozentsatz der verwendeten Mikroorganismen den Herstellungsprozeß lebensfähig überstehen, und im gegenständlichen Fall überraschenderweise geeignet, auch eine ausreichende Magensaftresistenz zu gewährleisten. Weiters wird durch das Vorliegen der Mikroorganismen in trocken-granulierter Form eine allenfalls angeschlossene weitere Verarbeitung erheblich erleichtert bzw. für die Verwendung als Lebensmittel-Zusatzstoff überhaupt erst ermöglicht (im Gegensatz zu der aus der Pharmaindustrie bekannten magensaftresistenten Lacken wie Eudragit®).

Besonders bevorzugte magensaftresistenten Matrixkomponenten sind Alginate (z.B. Natriumalginat), Zellulose bzw. deren Derivate (z.B. Hydroxypropylmethylzellulose (HPMC), HPMC-Acetat-Succinat, HPMC-Phthalat, Methacrylsäurederivate, Schellack, Galactomannane sowie Mischungen dieser Komponenten. Diese Substanzen haben sich in der Pharma- und/oder Lebensmittelindustrie bereits bewährt, gelten als unbedenklich und zeigen auch ausgezeichnete Eigenschaften im Hinblick auf die durch Trocknung stabilisierten Mikroorganismen. Besonders vorteilhafte Beispiele von HPMC bzw. HPMC-Derivaten umfassen HPMC-50SH 4000, HPMCP-HP 55 (gemäß US-Pharmacopeia XXIII, NF18, Nr. 2910 und Nr. 200731), und HPMC-Acetat-Succinat-LF (HPMC-AS-LF) (Firma Shin-Etsu, Japan).

Als Mikroorganismen werden im besonderen Milchsäurebakterien, vorzugsweise aus den Gattungen Streptococcus, Lactobacillus, Enterococcus und Bifidobacterium, aber auch Enterobacteriaceae, vorzugsweise die Gattungen Enterobacter und Escherichia in den erfindungsgemäßen Formulierungen verwendet, wobei die Geni bzw. Species Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus, Lactobacil-

lus acidophilus, Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus plantarum, Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, Enterococcus faecium, Bifidobacterium bifidum, Bifidobakterium infantis, Bifidobakterium longum, etc., physiologische Escherichia coli sowie Mischungen dieser Mikroorganismen besonders bevorzugt sind.

5 -

Bei den erwähnten Arten ist ihre probiotische Wirkung schon hinlänglich beschrieben worden; ihre lebensmitteltechnisch und pharmazeutisch große Bedeutung macht sie zu bevorzugten Mikroorganismen im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

Die erfindungsgemäße Formulierung umfaßt günstigerweise technisch notwendige Hilfsstoffe, also z.B. pharmazeutische Trägerstoffe und/oder Formulierungshilfsstoffe, wie Tablettierungsmittel, konsistenzerhöhende Mittel, Stabilisatoren, lebensmitteltechnische Zusatzstoffe, etc..

Die erfindungsgemäße probiotisch wirksame Formulierung umfaßt in der Regel

- 10 bis 90 Gew.-% durch Trocknung stabilisierte Mikroorganismen,
- 10 bis 90 Gew.-% magensaftresistente Matrixkomponenten und
- 0 bis 50 Gew.-% technisch notwendige Hilfsstoffkomponten

Besonders bevorzugt sind Formulierungen welche 30 bis 70, insbesondere 30 bis 55 Gew.-%, an stabilisierten Mikroorganismen aufweisen.

Formulierungen, welche erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugt werden, sind solche, die durch Trocknung stabilisierte Mikroorganismen der Spezies Enterococcus faecium und/oder Lactobacillus acidophilus, sowie Natriumalginat und/oder Hydroxypropylmethylzellulose oder eines ihrer Derivate und Magnesiumstearat umfassen.

Bei diesen Formulierungen konnte in vitro die höchste Resistenz

gegenüber Magensaft (0,1 N HCl) festgestellt werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen probiotisch wirksamen Formulierungen als Zusatzstoffe für Lebensmittel und zur Herstellung von Medikamenten, insbesondere zur Herstellung von Präparationen zur Behandlung von Störungen der Darmflora.

Noch ein Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt in einem Verfahren zur Herstellung von probiotisch wirksamen Formulierungen, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- Bereitstellen von durch Trocknen stabilisierten Mikroorganismen,
- Mischen der stabilisierten Mikroorganismen mit magensaftresistenten Matrixkomponenten,
- Trocken-Granulieren der erhaltenen Mischung, wobei gemäß einer besonderen Ausführungsform mehr als ein Granulierungsschritt vorgesehen wird.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgende Beispiele, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, noch weiter erläutert.

Beispiele:

Herstellung von Granulaten (Trockengranulierung):

Die Mikroorganismen werden mit den entsprechenden magensaftresistenten Matrixkomponenten und gegebenenfalls mit weiteren, insbesondere zur Kompaktierung notwendigen Hilfsstoffkomponenten gemischt (Kubusmischer, Firma ERWEKA) und mit einer Exzenterpresse (Type EK 0, Firma KORSCH) zu Komprimaten mit einem Durchmesser von 10 mm verpreßt. Der dabei aufgewendete Preßdruck beträgt 15 kN. Die erhaltenen Preßlinge werden in weiterer Folge mittels eines Trockengranuliergerätes (Gerätetype TG 2/S, Firma ERWEKA) zum Granulat verarbeitet und dieses wird anschließend unter Verwendung eines Siebturms (Firma RETSCH) klassiert. Granulate mit Partikeldurchmessern von 2,0 bis 4,0 mm werden wei-

teren Untersuchungen, wie z.B. der Bestimmung von Ausgangskeimzahlen, Überlebenskeimzahlen, etc., zugeführt.

Da das Einbringen der Granulate in eine 0,9 %-ige NaCl-Lösung eine starke Quellung der Hilfsstoffe bedingt, wird vor der Keimzahlbestimmung mit Glaskügelchen geschüttelt, um eine Zerstörung der gequollenen Hilfsstoffhülle und dadurch die Freisetzung der Bakterien aus den trockenen Granulatkernen zu gewährleisten. Hierfür werden den Bakterien-Suspensionen sterile Glaskügelchen zugesetzt und mehrmals in horizontaler Bewegung geschüttelt. Im Anschluß daran werden die Keimzahlen mittels Koch'schem Plattengußverfahren ermittelt.

Bestimmung der Überlebenskeimzahl nach Inkubation in 0,1 N HCl:

Zur Simulation einer Magenpassage wird 1,00 g der Probe mit 94,0 ml 0,1 N HCl versetzt und 1 h am Schüttelwasserbad (Firma GFL, Type 1083) bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit 2 ml 5 N NaOH und 3 ml einer wäßrigen 1 M $\rm Na_2HPO_4$ -Lösung neutralisiert (ca. pH 7) und die Keimzahl nach dem Koch'schen Plattengußverfahren bestimmt.

Bei der Untersuchung von reinen Lyophilisaten hinsichtlich Magensaftresistenz kann folgender Umstand zu verfälschten Ergebnissen führen: Das Lyophilisat kann sich bereits bei der Beschickung der Verdünnungsflaschen an die Glaswandung anlagern, wodurch die Bakterien im trockenen Film unter einer feuchten Schutzschicht teilweise überleben. Bei Untersuchungen mit reinen Lyophilisaten muß daher die Verdünnungsflasche von Anfang an einer gleichmäßigen Schüttelbewegung unterzogen werden um das Absetzen des Lyophilisats am Boden zu verhindern.

1. Verarbeitung von Enterococcus faecium M74-Bakterien

Eine kommerziell erhältliche Präparation des Stammes Enterococcus faecium M74 (Firma Medipharm AB, Schweden) - Lactiferm L50 - wurde für die vorliegenden Untersuchungen herangezogen und
ein erfindungsgemäßes Granulat entsprechend den oben beschriebe-

nen Verfahren mit unterschiedlichen Hilfsstoffkomponenten hergestellt. Die kulturelle Lebendkeimzahlbestimmung wurde für das Ausgangs-Lyophilisat, das Ausgangs-Granulat, sowie für die Präparationen nach Inkubation in 0,1 N HCl ("Überlebenskeimzahl") vorgenommen. Der Nachweis erfolgte durch Plattierung auf Enterokokken-Selektivagar (Slanetz und Bartley; Milieu: aerob für 48 hbei 37°C).

1.1.: Granulat mit Natriumalginat

Rezeptur der Formulierung:

- 10,0 g lyophil. Enterococcus faecium M74
- 10,0 g Natriumalginat
- 1,0 g Magnesiumstearat
- 10,0 g CaHPO

1.2.: Granulat mit HPMC-Phthalat

Rezeptur der Formulierung:

- 10,0 g lyophil. Enterococcus faecium M74
- 10,0 g HPMC-Phthalat
 - 1,0 g Magnesiumstearat

1.3.: Ergebnisse der Prüfung hinsichtlich Magensaftresistenz:

	Ausgangskeimzahl	Überlebenskeimzahl nach Inkubation in 0,1 N HCl
Lyophilisat Granulat mit	2,8 x 10 ¹⁰	4.0×10^5
Natriumalgina HPMC-Phthalat		6.0×10^6 3.0×10^7

Tabelle 1

Angaben in Kolonien bildende Einheiten (colony forming units (CFU)/g

Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, daß mit den erfindungsgemäßen Präparationen die Überlebenszahlen der Bakterien deutlich (z.T. um über 2 Zehnerpotenzen) gesteigert werden konnte.

2. Verarbeitung von Enterococcus faecium SF-68-Bakterien

Eine kommerziell von der Firma Chr. Hansen's bio systems, Horsholm, Dänemark, erhältliche Präparation des Stammes Enterococcus faecium SF-68 (APP 396), wurde für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen herangezogen und ein erfindungsgemäßes Granulat gemäß den oben beschriebenen Herstellungsverfahren mit unterschiedlichen Matrixkomponenten hergestellt. Keimzahlbestimmungen erfolgten für das Ausgangs-Lyophilisat, das Ausgangs-Granulat, sowie für die Präparationen nach Inkubation in 0,1 N HCl ("Überlebenskeimzahl").

2.1.: Granulat mit HPMC-Acetat-Succinat

Die Komponenten für einen ersten Kompaktiervorgang werden gemischt und komprimiert. Anschließend werden die Komprimate zu einem Granulat A als Zwischenprodukt granuliert. Das Granulat A wird erneut mit weiteren notwendigen Komponenten (z.B. mit gleichen Masseteilen HMPC-Acetat-Succinat-Granulat) komprimiert und zu einem Endprodukt (Granulat B) granuliert. Durch diese Herstellungstechnologie wird die Einbettung der Mikroorganismen in die stabilisierend wirkende Matrix durch mehrere einfach durchführbare Verfahrensschritte optimiert.

Rezeptur der Formulierung: (Granulat A)

- 12,0 g Hansen APP 396 (Ent. faec. SF-68)
 - 8,0 g HPMC-Acetat-Succinat-LF
- 12,0 g Magnesiumstearat

Die gemäß dem oben angegebenen Mischungsverhältnis hergestellte Pulvermischung wurde trocken granuliert, das Granulat anschließend 1:1 mit HPMC-AS-LF-Granulat gleicher durchschnittlicher Korngröße gemischt und nochmals dem Trockengranulierungsprozeß unterzogen.

2.2.: Granulat mit HPMC-Phthalat

Rezeptur der Formulierung:

- 10,0 g Hansen APP 396 (Ent. faec. SF-68)
- 10,0 g HPMC-Phthalat
- 1,0 g Magnesiumstearat

2.3.: Granulat mit Natriumalginat und HPMC

Rezeptur der Formulierung:

- 10,3 g Hansen APP 396 (Ent. faec. SF-68)
- 12,8 g HPMC 60SH-4000
- 5,1 g Natriumalginat
- 1,4 g Magnesiumstearat

2.4.: Ergebnisse der Prüfung hinsichtlich Magensaftresistenz:

	Ausgangskeimzahl	Überlebenskeimzahl nach Inkubation in 0,1 N HCl
Lyophilisat	$1,4 \times 10^{12}$	8 x 10 9
Granulat mit		
HPMC-AS-LF	$3,7 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{8}$
HPMC-Phthalat	$1,2 \times 10^{11}$	1.4×10^9
Natriumalginat		
+HPMC60SH-4000	$2,4 \times 10^{11}$	1,7 x 10 ¹⁰

Tabelle 2

Angaben in CFU/q

3. Verarbeitung von Lactobacillus acidophilus-Keimen

Eine kommerziell von der Firma Wiesby erhältliche Präparation des Stammes Lactobacillus acidophilus (Wiesby L. acidophilus Nr.145) wurde für die vorliegenden Untersuchungen herangezogen und ein erfindungsgemäßes Granulat entsprechend den oben beschriebenen Verfahren mit unterschiedlichen Hilfsstoffkomponenten hergestellt. Die kulturelle Lebendkeimzahlb stimmung wurde

für das Ausgangs-Lyophilisat, das Ausgangs-Granulat sowie für die Präparationen nach Inkubation in 0,1 N HCl ("Überlebenskeimzahl") vorgenommen. Der Nachweis erfolgte durch Plattierung auf Rogosa-Agar (Milieu: anaerob für 72 h bei 37°C; Lit.: Mitsuoka, Zbl.Bakt.I. Orig., 210 (1969), 32-51); die Bestimmung der Überlebenskeimzahlen erfolgte in gleicher Weise.

3.1.: Granulat mit Natriumalginat und HPMC

Rezeptur der Formulierung: 61,5 g L. acidophilus-Lyophilisat

25,6 g HPMC 60 SH-4000 10,2 g Natriumalginat 2,7 g Magnesiumstearat

3.2.: Granulat mit HPMC-Acetat-Succinat

Rezeptur der Formulierung: 49,5 g L. acidophilus-Lyophilisat
49,5 g HPMC-Acetat-Succinat - LF
1,0 g Magnesiumstearat

3.3.: Granulat mit größeren HPMC-Acetat-Succinat-Anteilen ("Granulatgemisch")

Herstellung: siehe 2.1.

Rezeptur der Formulierung: 20 g L.acidophilus-Lyophilisat

20 g Magnesiumstearat

60 g HPMC-Acetat-Succinat - LF

3.4.: Untersuchungen zur Magensaftresistenz:

Granulat- bzw. Lyophilisat-Proben wurden jeweils nach 0, 15, 30, 45 und 60 min Inkubation in 0,1 N HCl gezogen und deren Keimzahl bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Zu Vergleichszwecken wurde reines Bakterienlyophilisat und granuliertes Lyophilisat in die Untersuchungen einbezogen.

Zeit	Keimgehalt	Keimgehalt	Keimgehalt	Keimgehalt	Keimgehalt
(min)	Na-alg.+HPMC	HPMC-AS-LF	HPMC-AS-LF	Lyophilisat	Lyophilisat
	Granulat	Granulat	Granulat-	Granulat	

			010	01 4.1.G.L.G.C	
			gemisch		
0	5,0 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	4,4 x 10 ⁸	2,2 × 10 ⁹
15	$1,1 \times 10^{6}$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
30	$4,0 \times 10^{5}$	$5,2 \times 10^{5}$	$2,3 \times 10^{6}$	n.b.	n.b.
45	$3,6 \times 10^{5}$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
60	$3,4 \times 10^{5}$	$1,1 \times 10^{5}$	$1,7 \times 10^{6}$	0	0

n.b. nicht bestimmt
Angaben in CFU/g

Tabelle 3

Diese Ergebnisse belegen deutlich, daß die erfindungsgemäßen Formulierungen eine umfassende Magensaftresistenz der verabreichten Mikroorganismen gewährleisten, sodaß eine zufriedenstellende Wirkung im Darmbereich erzielt werden kann. Es zeigte sich weiters, daß die erfindungsgemäßen Formulierungen auch eine erhöhte Lagerbeständigkeit gegenüber herkömmlichen Formulierungen ermöglichen.

Patentansprüche:

- Probiotisch wirksame Formulierung, umfassend durch Trocknung stabilisierte Mikroorganismen und magensaftresistente Matrixkomponenten, welche Formulierung in trocken-granulierter Form vorliegt.
- 2. Probiotisch wirksame Formulierung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die magensaftresistenten Matrixkomponenten ausgewählt sind aus Natriumalginat, Hydroxypropylmethylzellulose und deren Derivaten, Methacrylsäurederivaten und Galactomannanen sowie insbesondere Mischungen dieser Komponenten.
- 3. Probiotisch wirksame Formulierung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Trocknung stabilisierten Mikroorganismen ausgewählt sind aus den Familien Lactobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen Streptococcus, Lactobacillus, Enterococcus und/oder Bifidobacterium, und Enterobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen Enterobacter und/oder Escherichia.
- 4. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Trocknung stabilisierten Mikroorganismen ausgewählt sind aus den Arten Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus plantarum, Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, Enterococcus faecium, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum und physiologische Escherichia coli sowie Mischungen dieser Mikroorganismen.
- 5. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiters technisch notwendige Hilfsstoffe, wie pharmazeutische Trägerstoffe

und/oder Formulierungshilfsstoffe, enthält.

- 6. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie
 - 10 bis 90 Gew.-% durch Trocknung stabilisierte Mikroorganismen,
 - 10 bis 90 Gew.-% magensaftresistente Matrixkomponenten und
- 0 bis 50 Gew.-% technisch notwendige Hilfsstoffe umfaßt.
- 7. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Trocknung stabilisierte Mikroorganismen der Spezies Enterococcus faecium und/oder Lactobacillus acidophilus, Natriumalginat und/oder Hydroxypropylmethylzellulose oder eines ihrer Derivate und Magnesiumstearat umfaßt.
- 8. Verwendung von probiotisch wirksamen Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Zusatzstoffe für Lebensmittel.
- Verwendung von probiotisch wirksamen Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments.
- 10. Verwendung von probiotisch wirksamen Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung einer Präparation zur Behandlung von Störungen der Darmflora.
- 11. Verfahren zur Herstellung von probiotisch wirksamen Formulierungen umfassend die Schritte:
- Bereitstellen von durch Trocknen stabilisierten Mikroorganismen,
- Mischen der stabilisierten Mikroorganismen mit magensaftresistenten Matrixkomponenten,
- Trocken-Granulieren der erhaltenen Mischung, wobei vorzugsweise mehr als ein Granulierungsschritt vorgesehen wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Internation

	INTERNATIONAL SEARCH	REPORT	Internation	Application No
			PCT/AT	96/00214
A. CLASS IPC 6	ification of subject matter A61K35/74 A23L1/03			
	o International Patent Classification (IPC) or to both national classification	ation and IPC		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Minimum d	ocumentation searched (classification system followed by classification	symbols)		
IPC 6	A61K A23L C12N			
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that suc	h documents are inc	duded in the fi	elds searched
Electronic	lata base consulted during the international search (name of data base a	and, where practical	, search terms (used)
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant	vant passages		Relevant to claim No.
х	DATABASE WPI Section Ch, Week 8916 Derwent Publications Ltd., London, Class A96, AN 89-119459 XP002025911	•		1-11
	& JP 01 066 124 A (FREUND SANGYO K March 1989 see abstract			
X	EP 0 627 173 A (GIULIANI S.P.A.) 7 December 1994 see page 3, line 14 - line 42; cla examples 4,5 see page 4, line 15 - line 18			1-11
	-/			
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent lamily	members are	listed in annex.
'A' docum	sent defining the general state of the art which is not lered to be of particular relevance	or priority date a cited to understar invention	nd not in confl nd the principle	he international filing date lict with the application but e or theory underlying the
"L" docum which citatio "O" docum other	care ent which may throw doubts on priority claim(s) or	cannot be consided involve an invention of participant of participant of participant is comment in the consistency of	ered novel or o live step when I icular relevano ered to involve bined with one	e; the claimed invention cannot be considered to the document is taken alone e; the claimed invention an inventive step when the or more other such docu-obvious to a person skilled
	than the priority date claimed &	document member	of the same	patent family
	actual completion of the international search 1 February 1997		f the internation 0. 03. 97	nal search report
	mailing address of the ISA	Authorized office	,	
	European Patent ffice, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Ripwyk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31-70) 340-3016	Ryckeb	osch, A	·

Form PCT/ISA/219 (second sheet) (July 1992)

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Internation Application No DCT/AT 96/00214

	PCT/AT 96/00214	
	ation) D CUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 89 05849 A (CHR. HANSEN'S LABORATORIUM A/S) 29 June 1989 see page 10, line 26 - page 11, line 25; claims; example 5 see page 12, line 3 - line 22 see page 13, line 4 - line 11	1-11
P,X	WO 95 34292 A (RECORDATI S.A. CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL COMPANY) 21 December 1995 see the whole document	1-11

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internation pplication No
PCT/AT 96/00214

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-627173	07-12-94	IT-B- CA-A-	1265092 2124631	30-10-96 01-12-94
W0-A-8905849	29-06-89	NONE		
W0-A-9534292	21-12-95	AU-A-	2537195	05-01-96

Internatio Aktenzeichen
PCT/AT 96/00214

		. PC	T/AT 96/00214
A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES A61K35/74 A23L1/03		
Nach der Int	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas	milikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE		
Re cherchiert IPK 6	er Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol A61K A23L C12N	c)	
Recherchiert	te aber meht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	veit diese unter die recherc	hierten Gebiete fallen
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	me der Datenbank und er	vd. verwendete Suchbegnffe)
C MEWI	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommend	en Teile Betr. Anspruch Nr.
Х	DATABASE WPI Section Ch, Week 8916 Derwent Publications Ltd., London,	GB:	1-11
	Class A96, AN 89-119459 XP002025911 & JP 01 066 124 A (FREUND SANGYO I 13.März 1989 siehe Zusammenfassung		
X	EP 0 627 173 A (GIULIANI S.P.A.) 7.Dezember 1994 siehe Seite 3, Zeile 14 - Zeile 48 Ansprüche; Beispiele 4,5 siehe Seite 4, Zeile 15 - Zeile 18		1-11
▼ Wei	itere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	X Siebe Anhang Pat	entfamilie
*Besonder *A* Veröfi aber i *E* älterer Annu *L* Veröfi schei ander	fentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist a Dohument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen	T Spätere Veröffentlichus oder dem Prioritätsdas Anmeldung mcht kolli Erfindung zugrundelle Theorie angegeben ist X' Veröffentlichung von kann allein aufgrund erfinderischer Tätigkei Y' Veröffentlichung von kann nicht als auf erfinwerden, wenn die Ver	ng, die nach dem internationalen Anmeldedatur um veröffentlicht worden ist und mit der diert, sondern nur zum Verständnis des der genden Prinzips oder der ihr zugrundellegender besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindi- lieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf t beruhend betrachtet werden besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindi- nderischer Tätigkeit berühend betrachtet öffentlichung mit einer oder mehreren anderen
O" Veröl eine P" Veröl dem	Mentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	Veröffentlichungen die diese Verbindung für '&" Veröffentlichung, die	eser Kategorie in Verbindung gebracht wird un einen Fachmann naheliegend ist Mitglied derselben Patentfamilie ist ernationalen Recherchenbenchts
	21. Februar 1997	1 0. 03. 97	
Name und	l Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk	Bevollmächtigter Bedi	ensteter
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Ryckebos	ch, A

Internation Aktenzeichen
PCT/AT 96/00214

		PCT/AT 96/00214	
C.(Fortsetzi	mg) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	!	
Kategone*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kom	menden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 89 05849 A (CHR. HANSEN'S LABORATORIUM A/S) 29.Juni 1989 siehe Seite 10, Zeile 26 - Seite 11, Zeile 25; Ansprüche; Beispiel 5 siehe Seite 12, Zeile 3 - Zeile 22 siehe Seite 13, Zeile 4 - Zeile 11		1-11
P,X	WO 95 34292 A (RECORDATI S.A. CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL COMPANY) 21.Dezember 1995 siehe das ganze Dokument		1-11
		·	
	·		

1

Internation Aktenzeichen
PCT/AT 96/00214

	PCT/AT 96/00214		0/00214
	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategone'	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	nenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 89 05849 A (CHR. HANSEN'S LABORATORIUM A/S) 29.Juni 1989 siehe Seite 10, Zeile 26 - Seite 11, Zeile 25; Ansprüche; Beispiel 5 siehe Seite 12, Zeile 3 - Zeile 22 siehe Seite 13, Zeile 4 - Zeile 11		1-11
P,X	WO 95 34292 A (RECORDATI S.A. CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL COMPANY) 21.Dezember 1995 siehe das ganze Dokument		1-11
	·		
	·		

1

Angaben zu Veröffentlichungen, "e zur selben Patentfamilie gehören

Internation 1 Aktenzeichen
PCT/AT 96/00214

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied Patenti	l(er) der familie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-627173	07-12-94	IT-B- CA-A-	1265092 2124631	30-10-96 01-12-94
WO-A-8905849	29-06-89	KEINE		
WO-A-9534292	21-12-95	AU-A-	2537195	05-01-96